

Recebido em 18 de Outubro de 1977

Influência da alimentação da *Lymantria dispar* L. e da *Euproctis chrysorrhoea* L. na actuação do *Bacillus thuringiensis* (*)

por

MARIA TERESA E. C. CABRAL
Engenheiro Silvicultor — Departamento de Ecologia
das Populações
Estação de Biologia Florestal

No dizer de Bovey (1971) «a evolução da ciência a que assistimos e o predomínio crescente da técnica sobre a nossa civilização estão associadas a um fenómeno único na história do homem — a pululação da sua própria espécie», mais vulgarmente denominada explosão demográfica.

Para que a espécie humana possa sobreviver tem mais do que nunca que contrabalançar a satisfação das necessidades vitais próprias pelo engenho. Entre os numerosos obstáculos a vencer, um dos de maior importância é, ainda segundo Bovey, «a concorrência constante com os insectos que realizaram o paradoxo de tornar a sua ameaça mais grave à medida que a civilização consegue novas conquistas».

O assunto de que nos ocupamos — combate às pragas florestais — não é mais do que uma pequena parcela da luta que a Huma-

(*) Trabalho realizado em 1974 na cadeira de Entomologia Florestal do Instituto Superior de Agronomia e subsidiado pelo Fundo Especial de Caça e Pesca.

nidade tem travado desde sempre contra as pragas e terá certamente que continuar a travar embora com muito maior impacto no combate aos insectos vectores de doenças, ou às pragas que atacam tanto as culturas agrícolas como os produtos depois de armazenados.

As características do ambiente florestal, onde a intervenção humana alterou o meio natural, imprimem, no entanto, a esta luta aspectos bem distintos devido sobretudo à maior permanência das árvores no terreno submetidas a revoluções que podem atingir muitas dezenas de anos. Em consequência desta permanência tem sido possível acompanhar-se a evolução das populações dos insectos que estão na origem das pragas das florestas durante muitos anos, estando o estudo da sua dinâmica muito mais avançado que o das agrícolas.

E se hoje não se pode pensar em abolir qualquer intervenção, no sentido de fazer baixar os níveis populacionais das pragas florestais, é opinião quase unânime de todos os entomologistas florestais que esta só deverá fazer-se com base num somatório de conhecimentos que garantam o mínimo de prejuízos para o meio ambiente sendo, sobretudo, de considerar a profilaxia.

Assim, a biologia e dinâmica populacionais das pragas, os estudos biocenóticos e a observação das modificações introduzidas no meio, que possam ser responsáveis pelo aparecimento de uma praga devem ser sempre ponderadas conscienciosamente e não recorrer exclusivamente à luta química, com todos os inconvenientes já reconhecidos que advêm da sua aplicação.

Embora muito sucintamente, vale a pena relembrar aqui os inconvenientes da utilização imoderada e excessiva deste meio de luta: aparecimento de espécies resistentes (que em 1971 foram computadas em cerca de 200); surto de novas pragas em virtude de desequilíbrios provocados; poluição generalizada do meio em consequência não só de intoxicação aguda mas também a longo prazo devido à «concentração biológica» dos pesticidas através das cadeias alimentares (os seus teores podem aumentar milhares de vezes), prosseguindo mesmo depois de se interromper a aplicação (Meadows, 1973); eliminação simultânea dos parasitas e predadores que desempenham papel importante no controle das populações de insectos.

No caso dos tratamentos químicos das pragas das nossas florestas apenas o primeiro aspecto focado não será talvez de temer a curto prazo uma vez que a maioria das espécies em questão é uni-voltina. Todos os outros perigos virão a verificar-se em maior ou

menor escala com os prejuízos que daí resultam tanto para o homem como para a fauna selvagem.

Devido à complexidade do combate às pragas florestais existem em quase todos os países, sempre que a floresta desempenha um papel importante e muitos deles com uma percentagem de área florestal muito inferior à nossa, grupos de trabalho que se ocupam dos vários aspectos a ser encarados e de que se destacam os serviços de inventários («Survey») que servem de base à previsão. Este conhecimento possibilita planejar a melhor forma e momento oportuno de intervir. Há ainda a considerar os núcleos de luta biológica que estudam essencialmente o modo de fazer baixar a população sem os inconvenientes apontados.

Quando as intervenções são imprescindíveis há porém a preocupação de evitar a poluição causada pelos pesticidas procurando-se produtos de grande selectividade e rápida decomposição ou a utilização de parasitas (existem já hoje meios de criação em massa de parasitas no laboratório — as «fábricas de parasitas») ou recorre-se ainda aos produtos microbiológicos fabricados com microrganismos patogénicos para os insectos que, quando são de grande selectividade, afectam em menor escala os parasitas e os predadores que de futuro se encarregam de condicionar a evolução da população e não prejudicam o homem nem as espécies selvagens. Considera-se ainda recentemente como que uma «terceira geração» de pesticidas que engloba a luta autocida (esterilização de machos, hormonas sexuais e juvenil, «anti-feedings») já usadas com sucesso nalguns casos.

A luta integrada que coordena os vários meios de luta é a solução mais racional e está hoje a ser bastante usada sobretudo nos países em que a Indústria de Pesticidas não tomou grande incremento.

Embora defendendo que só um trabalho de equipa bem coordenado poderá levar à cabal solução do combate às pragas florestais, consideramos que todo o trabalho feito segundo esta concepção poderá contribuir para se acumularem conhecimentos úteis que servirão de base àquela luta.

Tendo-nos proposto estudar a possibilidade de aplicar a luta microbiológica no combate às pragas dos montados, começamos por nos ocupar da acção de produtos à base de *B. thuringiensis*, sobre algumas dessa pragas por serem estes os microrganismos que apresentavam melhores possibilidades de aplicação prática imediata visto já estarem comercializadas e além disso ter já sido comprovada (Bur-

gues, 1972) a sua grande inocuidade, em relação à vida selvagem e aos insectos úteis. A homologação desses produtos na América, França e Alemanha foi baseada em numerosos ensaios, de que existem vários relatórios publicados, merecendo pois a maior confiança a sua utilização.

Acresce que a sua aplicação generalizada, nomeadamente no combate às pragas florestais em extensas áreas, vem-se já realizando há cerca de 20 anos sem consequências nefastas o que constitui mais uma confirmação de que não haverá prejuízos a temer.

Revista a bibliografia verificámos que as doses preconizadas de *Bacillus thuringiensis* para combater o burgo, a portésia e a lagarta do sobreiro em carvalhais eram elevadas e em trabalho anterior com a *L. dispar* tínhamos observado que a susceptibilidade deste insecto estava dependente do alimento sendo pouco sensível quando atacava sobreiro e muito quando o hospedeiro era o choupo.

Em face destes resultados admitimos que na composição das folhas de sobreiro poderia haver qualquer substância bactericida ou bacteriostática, mas evidentemente este assunto precisava ser esclarecido pois, a confirmar-se esta hipótese, tornava-se pouco provável que o *B. thuringiensis* pudesse interessar como solução económica na luta contra as pragas dos montados.

Procurámos esclarecer este assunto recorrendo a ensaios biológicos feitos com dois insectos, ambos pragas habituais do sobreiro: a *Lymantria dispar* L. e a *Euproctis chrysorrhoea*, as quais sendo espécies polífagas, permitiram comparar a actuação da batéria sobre o insecto em vários hospedeiros.

Escolhemos estirpes de bactérias que tanto através da bibliografia consultada, Burgerjon (1967) como dos resultados já por nós obtidos se tinham revelado com interesse para serem estudadas e realizámos ensaios para a *L. dispar* em sobreiro (*Q. suber*), carrasco (*Q. coccifera*) choupo (*Populus nigra*) e ulmeiro (*Ulmus scabra*). Para a *Euproctis chrysorrhoea* os três primeiros alimentos foram mantidos e o último substituído por amendoeira (*Prunus amygdaloides*) por não ser o ulmeiro uma espécie habitualmente atacada entre nós e a amendoeira ser pelo contrário muito vulgarmente atacada.

Para melhor facilidade de exposição e porque os ensaios tiveram que ser um pouco diferentes em virtude das características dos dois insectos, vamos referi-los separadamente tentando depois interpretar conjuntamente os resultados obtidos.

I — COMPARAÇÃO DA ACTUAÇÃO DAS ESTIRPES DE *B. THURINGIENSIS* E₀₁ E MORRISONI E DO PRODUTO COMERCIAL «DIPPEL», À BASE DA MESMA BACTÉRIA, SOBRE LARVAS DE *L. DISPAR* ALIMENTADAS DE CHOUPO (*POPULUS NIGRA*), ULMEIRO (*ULMUS SCABRA*), SOBREIRO (*QUERCUS SUBER*) E CARRASCO (*QUERCUS COCCIFERA*)

a) — CONTROLO DE MORTALIDADE

a.1) — MATERIAL E MÉTODOS

Insectos teste

As larvas usadas em todos os ensaios, tanto de redução do consumo alimentar como de controle de mortalidade, foram criadas no laboratório a partir de posturas colhidas num dos núcleos de montado de sobre situado na estrada Setúbal — Águas de Moura, a pequena distância daquela cidade. Em 1972 neste local a população atingiu nível elevado.

A colheita das posturas, que se encontravam principalmente no tronco (progradação Fot. 1), foi realizada no princípio de Março, cerca de um mês antes da eclosão normal no campo. Como é habitual, em laboratório os nascimentos foram um pouco antecipados, notando-se as primeiras eclosões a 22 de Março e prolongando-se durante cerca de três semanas. Para se obter um lote homogêneo de larvas criadas em condições perfeitamente idênticas com excepção do ali-



Fot. 1 — *Predomínio de posturas de L. dispar no tronco do sobreiro no local onde se fizeram as colheitas para os ensaios laboratoriais*

mento, não utilizamos no ensaio os nascimentos dos quatro primeiros e últimos dias.

Tivemos, portanto, um intervalo de 15 dias em que nasceram cerca de 500 larvas por dia que foram distribuídas por caixas plásticas contendo folhas de ulmeiro, de choupo, de carrasco e de sobreiro.

Usou-se sempre a rebentação nova de árvores das espécies respectivas, existentes na Tapada da Ajuda. Apenas para o sobreiro se recorreu na primeira semana a plantinhas provenientes de bolotas germinadas em meio artificial no laboratório, visto a rebentação desta espécie ser sempre um pouco mais tardia e termos interesse em realizar os ensaios, tanto quanto possível, simultaneamente.

As larvas foram criadas até ao fim do 2.º instar e quando notámos que estavam em pré-muda para o terceiro, separaram-se e mantiveram-se sem alimento. Usámos nos ensaios larvas acabadas de atingir o 3. instar para que o desenvolvimento fosse sempre idêntico.

Produtos:

Os produtos usados corresponderam às estirpes que nos ensaios realizados em anos anteriores se tinham distinguido, uma por dar os melhores resultados para o sobreiro (estirpe 8 Morrisoni) e outra por ser quase inactiva para as larvas alimentadas com esta espécie mas bastante eficaz para as larvas alimentadas com choupo — padrão internacional E₆₁. Ambas se apresentavam sob a forma de pó constituído pelos cristais e esporos misturados com matéria inerte e foram-nos fornecidos pelo Serviço de luta bacteriológica contra os insectos do Instituto Pasteur de Paris. Usou-se ainda o produto comercial «Dippel» de origem americana com base na estirpe Kurstaki.

Delineamento de ensaios:

O esquema e o modo operativo dos ensaios foram em tudo semelhantes aos já descritos (Cabral, 1972), pois estava comprovado serem eficazes e além disso um dos nossos propósitos era justamente confirmar os resultados anteriormente obtidos.

Consistiram na ingestão livre de discos foliares com 1 cm de diâmetro (4 por placa), que foram previamente tratados na torre

de pulverização segundo o esquema de Burgerjon e usando-se doses diferentes consoante os produtos e os alimentos (Quadro I) que foram escolhidos depois de ensaios prévios.

Pulverizaram-se simultâneamente todos os discos referentes a cada dose, regulando-se a torre de modo que a 10 cc de suspensão a que se juntou 0,2 cc de Lovo correspondesse um depósito de 1 mg/cm².

Para as larvas alimentadas de sobreiro e carrasco tivemos de ir aumentando as doses pois com as usadas para os outros alimentos a mortalidade foi nula, atingindo-se nestes ensaios os 32 g/l. Cada ensaio constava de 4 doses com cinco repetições de 10 larvas por dose, as quais eram colocadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro forradas com papel de filtro humedecido para manter frescas as rodelaas tratadas.

QUADRO I

Resumo dos elementos referentes aos ensaios de actuação de B. thuringiensis sobre L. dispar em vários alimentos

Alimento	Produto	Dose g/l	Data da aplicação
Choupo <i>Populus nigra</i>	<i>B. thuringiensis</i> estirpe I-E ₆₁	4 - 2 - 1 - 0,5	4/4/72 e 10/4/72
	<i>B. thuringiensis</i> estirpe 8 Morrisoni	4 - 2 - 1 - 0,5	7/4/72
Ulmeiro <i>Ulmus scabra</i>	<i>B. thuringiensis</i> estirpe I-E ₆₁	4 - 2 - 1 - 0,5	10/4/72 e 17/4/72
	<i>B. thuringiensis</i> estirpe 8 Morrisoni	4 - 2 - 1 - 0,5	7/4/72
	<i>Dippel</i>	2 - 1 - 0,5 - 0,25	18/4/72
Sobreiro <i>Quercus suber</i>	<i>B. thuringiensis</i> estirpe I-E ₆₁	16 - 8 - 4 - 2	24/4/72
	<i>B. thuringiensis</i> estirpe 8 Morrisoni	16 - 8 - 4 - 2	26/4/72 e 2/5/72
Carrasco <i>Quercus coccifera</i>	<i>B. thuringiensis</i> estirpe I-E ₆₁	32 - 16 - 8 - 4	10/4/72 e 24/4/72
	<i>B. thuringiensis</i> estirpe 8 Morrisoni	32 - 16 - 8 - 4	7/4/72 e 10/4/72
	<i>Dippel</i>	3,2 - 1,6 - 0,8 - 0,4	24/4/72

O contacto das larvas com o alimento infectado foi de 48 horas e depois deu-se-lhes alimento igual mas não tratado.

Os ensaios decorreram em câmaras climatizadas com a temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 70 % de humidade e a iluminação artificial com lâmpada fluorescente de 60 watts 16 horas por dia.

Terminaram sempre seis dias após a aplicação dos produtos sendo imediatamente feita a contagem das larvas mortas e sobreviventes.

O tratamento dos resultados obtidos foi feito num computador electrónico *, tendo-se determinado as rectas de regressão referentes ao valor do «probit» (percentagem da mortalidade) — log doses

Além destes dados referentes aos ensaios fizeram-se todas as determinações que pensámos nos pudessem dar a explicação do desigual comportamento das larvas em relação aos vários alimentos. Assim, pesaram-se amostras das larvas usadas nos ensaios em grupos de 10, pesaram-se igualmente rodela de folhas e fizeram-se determinações de pH tanto das larvas (intestino médio, hemolinfa) como das folhas.

As determinações de pH da hemolinfa e intestino foram feitas pela técnica já descrita (Heitor e Cabral 1967).

Maceradas as folhas num almofariz, o produto resultante foi colocado directamente num bolbo do eléctrodo e fez-se a determinação do pH.

As leituras foram efectuadas num Beckman modelo G. equipado com eléctrodo de gota simples.

a.2) — RESULTADOS

Os resultados das pesagens de larvas e discos foliares são dados simultaneamente com os de redução de consumo alimentar, visto estarem relacionados com eles.

Os valores para pH das folhas, da hemolinfa e do intestino médio das larvas estão indicados no (Quadro II).

As rectas de regressão nos ensaios estão indicadas no Quadro III e com elas foram construídos os gráficos I, II, III referentes aos resultados das estirpes Morrisoni, E_{01} e do produto Dippel.

(*) Agradecemos à colega Alcinda dos Santos Hall o delineamento e interpretação dos resultados bem como a revisão do original.

QUADRO II

Valores do pH das folhas e da hemolinfa e do intestino médio das lavras (4.ª instar) da L. dispar nos vários alimentos

Alimento	Valores do pH		
	Folhas	Hemolinfa	Intestino médio
Choupo	5,200	7,16 \pm 0,080	8,62 \pm 0,552
Ulmeiro	5,550	7,34 \pm 0,405	8,21 \pm 0,854
Sobreiro	4,025	7,32 \pm 0,254	9,16 \pm 0,826
Carrasco	4,088	7,09 \pm 0,105	8,03 \pm 0,599

A partir dos resultados dos ensaios em carrasco não podemos traçar as rectas uma vez que a mortalidade foi nula para as doses equivalentes às usadas nos outros ensaios.

Nestes últimos foi sempre possível fazer um ajustamento linear perfeito, como se pode ver para cada uma das regressões pelo somatório dos quadrados dos desvios para y. Os ensaios de repetição deram também valores concordantes em todos os casos.

Para interpretar os resultados seguimos dois critérios; comparámos os valores obtidos para cada um dos produtos nas várias essências florestais e o efeito dos vários produtos para cada alimento.

Quanto ao primeiro aspecto verificou-se que tanto para a estirpe Morrisoni (gráfico I) como para E_{61} (gráfico II) como ainda para o produto Dippel (gráfico III), quando aplicadas sobre as folhas de choupo, ulmeiro, carrasco e sobreiro, se obtiveram rectas sem relação de paralelismo, mas com diferenças significativas entre todas elas com excepção da actuação de E_{61} em choupo e ulmeiro que foi idêntica.

Para as duas estirpes (E_{61} — Morrisoni) no mesmo alimento nalguns casos a actuação foi idêntica noutros diversa.

Assim, para o choupo houve diferença significativa sendo a estirpe Morrisoni mais eficaz (LD_{50} 125 mg/l para a Morrisoni e 340,5 mg/l para a E_{61}).

QUADRO III

Regressões lineares referentes à actuação de duas estirpes do B. thuringiensis (E₆₁ e Morrisoni) e do produto comercial Dippel à base da mesma bactéria sobre larvas do 3.º instar de L. dispar em diversos hospedeiros

Estirpe	Alimento	Restas de regressão	Vb	Vy	m ± sm	DL 50 mg/l	Mortalidade referente a dose 4 g/l
E ₆₁	Choupo	y = 1,2555 + 1,4789 x	0,1096	0,136	2,5319 ± 0,1398	340,50	94,3
E ₆₁	Ulmeiro	y = 4,7150 + 0,4067 x	0,1796	0,1993	0,7008 ± 2,5551	5,02	88,1
E ₆₁	Carrasco	— *	—	—	—	—	0,0
E ₆₁	Sobreiro	— *	—	—	—	—	0,0
Morrisoni	Choupo	y = 3,43785 + 0,7450 x	0,0688	0,0109	2,0968 ± 0,3270	125,00	86,85
Morrisoni	Ulmeiro	y = 0,1093 + 1,5370 x y = 0,2801 + 1,6681 x	0,1622 0,3076	0,0196 0,0283	3,3242 ± 0,1018 3,1653 ± 0,1072	2109,50 1463,10	66,40 76,60
Morrisoni	Carrasco	— *	—	—	—	—	0,0
Morrisoni	Sobreiro	y = 8,2760 + 3,0600	—	0,1190	4,3385 ± 0,2276	21800,00	1,2
Dippel	Ulmeiro	— **	—	—	—	—	100,0
Dippel	Carrasco	y = 3,6324 + 2,0383 x	0,4359	0,029	4,2333 ± 0,0842	17112,00	9,8

* mortalidade nula nas doses ensaiadas.

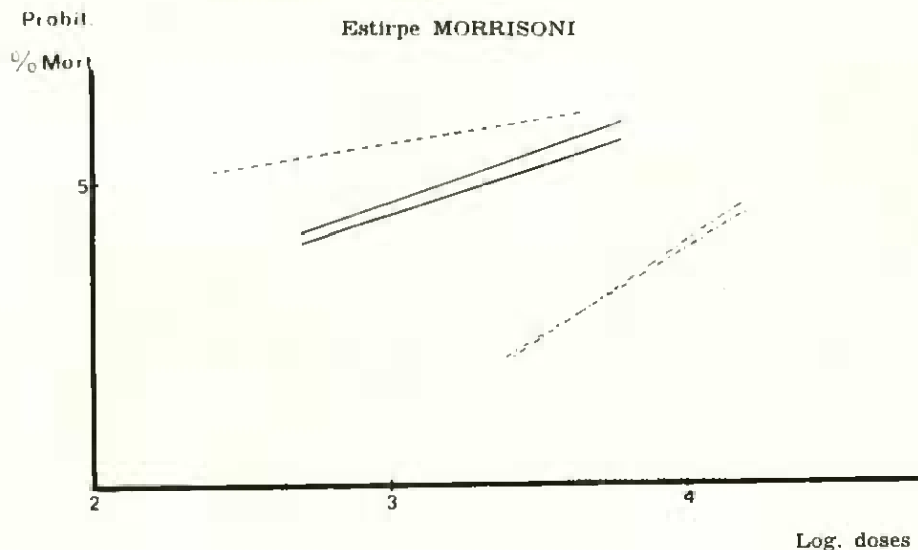
** 100 % de mortalidade nas doses ensaiadas.

Para o ulmeiro as diferenças também foram significativas sendo no entanto a E_{61} mais eficaz (LD_{50} 5,02 mg/1 para a E_{61} , 2109,5 e 1463,1 mg/1 para Morrisoni).

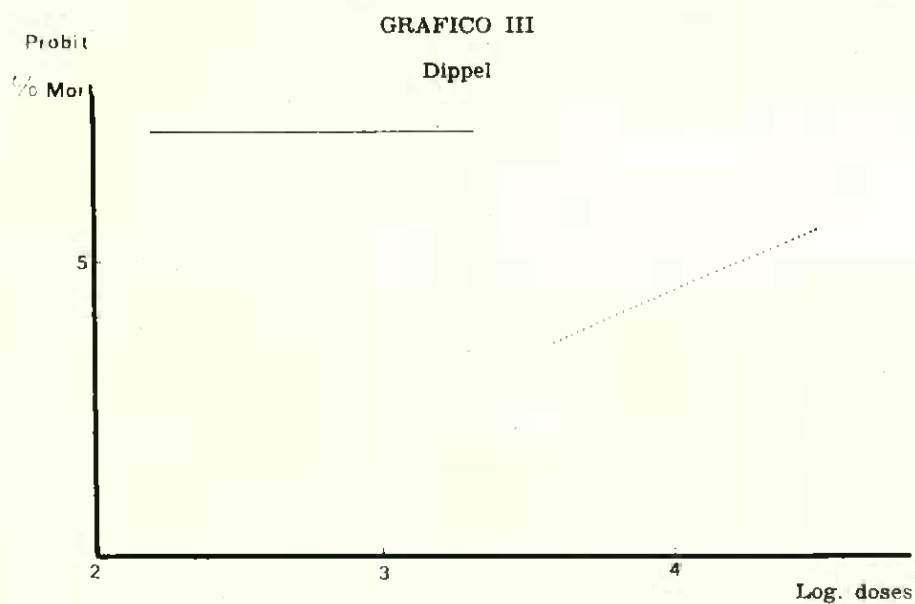
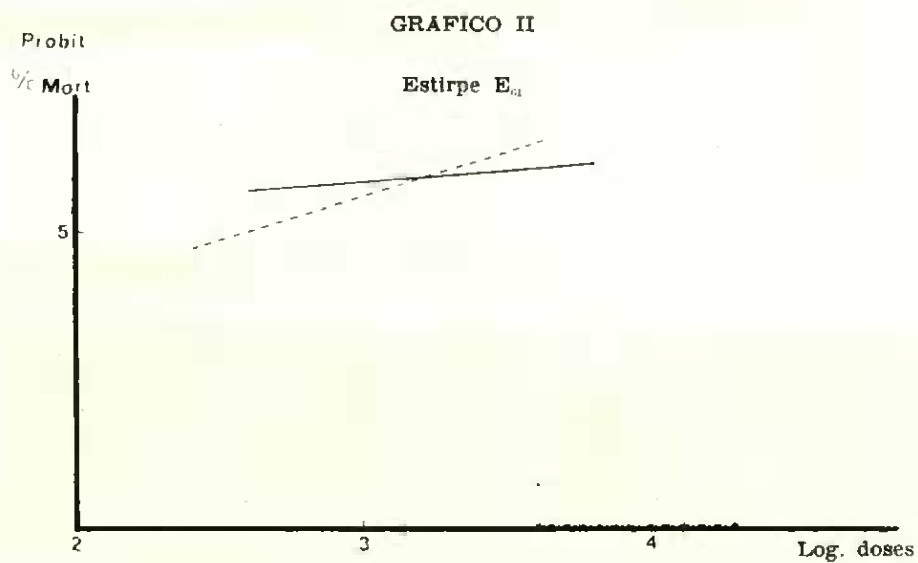
Entre o sobreiro e o carrasco houve também diferença de actuação da estirpe Morrisoni, que embora já mostrasse fraca actividade para a primeira espécie foi completamente ineficaz para a segunda. Para os ensaios feitos com as estirpes E_{61} não foi possível construir rectas de regressão quando se trabalhou com as espécies em causa, mesmo para uma dose de 32 g/l, oito vezes superior à mais elevada que se usou nos ensaios com choupo e ulmeiro.

Para tornar mais evidente a dependência existente para este insecto entre a mortalidade (referente a uma mesma dose e estirpe) e o hospedeiro construiu-se o gráfico IV.

GRAFICO I



.....	larvas alimentadas de Carrasco
-----	» » de Choupo
- - - - -	» » de Sobreiro
—————	» » de Ulmeiro



.....	larvas alimentadas de Carrasco
.....	» » de Choupo
.....	» » de Sobreiro
.....	» » de Ulmeiro

Estes resultados vieram confirmar os já obtidos em trabalho anterior, que considerou apenas o sobreiro e o choupo para alimento dos insectos.

Parece-nos ser possível agrupar em dois níveis a actuação da bactéria quanto à eficácia. Num estão incluídos o choupo e o ulmeiro em que ambas as estirpes actuaram bem, embora houvesse nalguns casos diferenças significativas; no outro o sobreiro e o carrasco em que a eficácia foi muitíssimo menor chegando mesmo a ser nula (ver Quadro III).

A variação do pH das folhas por si só não parece poder justificar esta diferença de actuação, embora haja também maior semelhança entre as espécies de cada grupo: 4,0 e 4,1 para o sobreiro e carrasco e 5,2 e 5,5 para o choupo e ulmeiro. Os valores de pH da hemolinfa foram muito idênticos e no intestino médio a variação foi também muito pequena.

Ao fazermos a dissecação das larvas para determinação de pH verificou-se ainda que o intestino dos insectos criados em sobreiro e carrasco era negro e nos outros alimentos verde claro.

Para confirmar se a inibição da bactéria estava relacionada com o alimento fez-se um outro ensaio introduzindo-se a seguinte alteração: passadas 48 h. de contacto das larvas com discos foliares de carrasco tratados com Dippel, verificou-se o consumo total destes mesmo para a doses de 3,2 g/l; substituíram-se as folhas de carrasco por folhas de choupo sem serem tratadas. Decorridas 24 horas as larvas estavam todas mortas, mesmo as das doses mais fracas, e os esfregaços feitos mostraram um bom desenvolvimento da bactéria, enquanto no ensaio anterior, em que se manteve a alimentação com carrasco, a mortalidade, como se disse foi muito reduzida (gráfico III). Repetido este ensaio obteve-se o mesmo resultado.

b) — REDUÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR (R. C. A.)

Julgamos que antes de entrar neste assunto é essencial dar algumas informações sobre os ensaios de «titulação biológica» baseados na R. C. A., pois tendo sido concebidos apenas para produtos bacterianos usados como insecticidas, é uma técnica pouco divulgada.

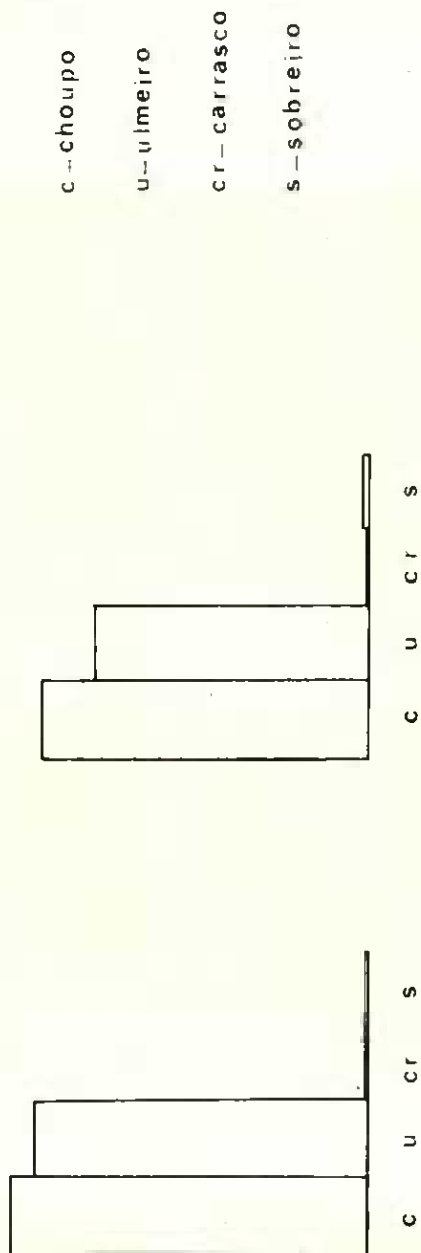
Entre os vários produtos microbiológicos que até hoje têm sido aplicados em tratamentos contra as pragas apenas os fabricados à base de *B. thuringiensis* foram comercializados e estão mesmo já

GRAFICO IV

Mortalidade comparada de *L. dispar* em vários hospedeiros devido à aplicação de *B. thuringiensis* (4 g/l)

estirpe E₆₁

estirpe Morrisoni



homologados em muitos países. Daí o interesse fundamental em se poder indicar qualquer elemento referente à sua eficácia, tal como se faz para todos os outros insecticidas.

Durante bastante tempo foi escolhido a contagem de esporos viáveis por unidade de peso. A evolução dos conhecimentos sobre o microorganismo veio mostrar que o poder patogénico era igualmente devido à presença de cristais romboédricos de natureza proteica formados durante a esporulação e, como estes eram proporcionais ao número de esporos, a sua contagem servia para medir também a toxicidade do produto.

Bonnefoi, Burgerjon e Grison (1958) constataram no entanto, que havia uma grande divergência entre o número de esporos calculados pelos métodos bacteriológicos habituais e a actividade insecticida das preparações provenientes de fermentações sucessivas; propuseram então que esta fosse substituída por uma «titulação biológica». Esta titulação pode basear-se na mortalidade ou na redução do consumo alimentar.

A titulação biológica por mortalidade é idêntica à descrita nos ensaios que fizemos para a *L. dispar*. O cálculo de título baseia-se no traçado de rectas de regressão (probits, % de mortalidade — log. dose) tanto de um padrão (E_{61}) como do produto a titular.

Burgerjon (1962) descreveu o processo da titulação por redução alimentar, que tem a vantagem de se realizar num período de 24 horas e além disso ser bastante preciso visto basear-se no primeiro sintoma de intoxicação provocado pela bactéria — paragem de alimentação — como consequência da acção da toxina do cristal.

Vamo-nos referir seguidamente com pormenor à técnica deste ensaio uma vez que nele nos baseamos para realizar os testes com *L. dispar* nos vários alimentos.

A medida de redução de consumo alimentar é feita por método fotométrico num dispositivo construído para este fim e constituído esquematicamente por uma lente convergente que, quando atravessada por um feixe luminoso passando através de diâmetro fixado, faz convergir esse feixe numa célula fotoelétrica colocada no foco a qual está ligada a um aparelho medidor de corrente. Escolhe-se uma fonte luminosa com intensidade regulável de modo a obter-se o valor 100 quando não há interposição de nenhum objecto e 0 quando se interrompe completamente a passagem da luz.

Vários dispositivos foram concebidos para medir consumos alimen-

tares alguns com o fim de serem usados não em ensaios como estes mas nos de preferência alimentar, Goeden (1969, 1970).

A calibração de qualquer destes aparelhos é sempre feita por interposição de objectos de áreas conhecidas entre a fonte luminosa e a célula.

As leituras feitas no galvanómetro, correspondentes a cada área, devem estar em relação linear com esta, obtendo-se uma recta de calibração por processo semelhante ao usado em espectrofotometria.

Descrevemos esta técnica de ensaio pois foi precisamente a que reproduzimos nos sensaios com *L. dispar*, tendo-se construído um dispositivo segundo o esquema de Burgerjon (1962) que permitiu fazer as leituras com eficiência. A recta de calibração indicada no gráfico V refere-se ao aparelho que foi montado para esse fim, tendo-se usado um aparelho medidor de corrente com uma escala graduada de 0 a 50.

As larvas utilizadas deverão pertencer a um lote homogêneo e são, tal como nos ensaios de mortalidade, separadas na pré-muda para o 3.º instar estando sem alimentação até ao momento de serem usadas.

Habitualmente o ensaio consta de 4 doses com 4 repetições de 15 larvas por dose; tanto os discos foliares como os grupos de larvas são previamente pesados de modo a obter-se uma distribuição uniforme das diferenças de peso.

A proporção entre o número de larvas e o diâmetro de discos foliares foi obtido por tentativas de modo a que estas deveriam consumir uma rodela não tratada no intervalo aproximado de 24 horas.

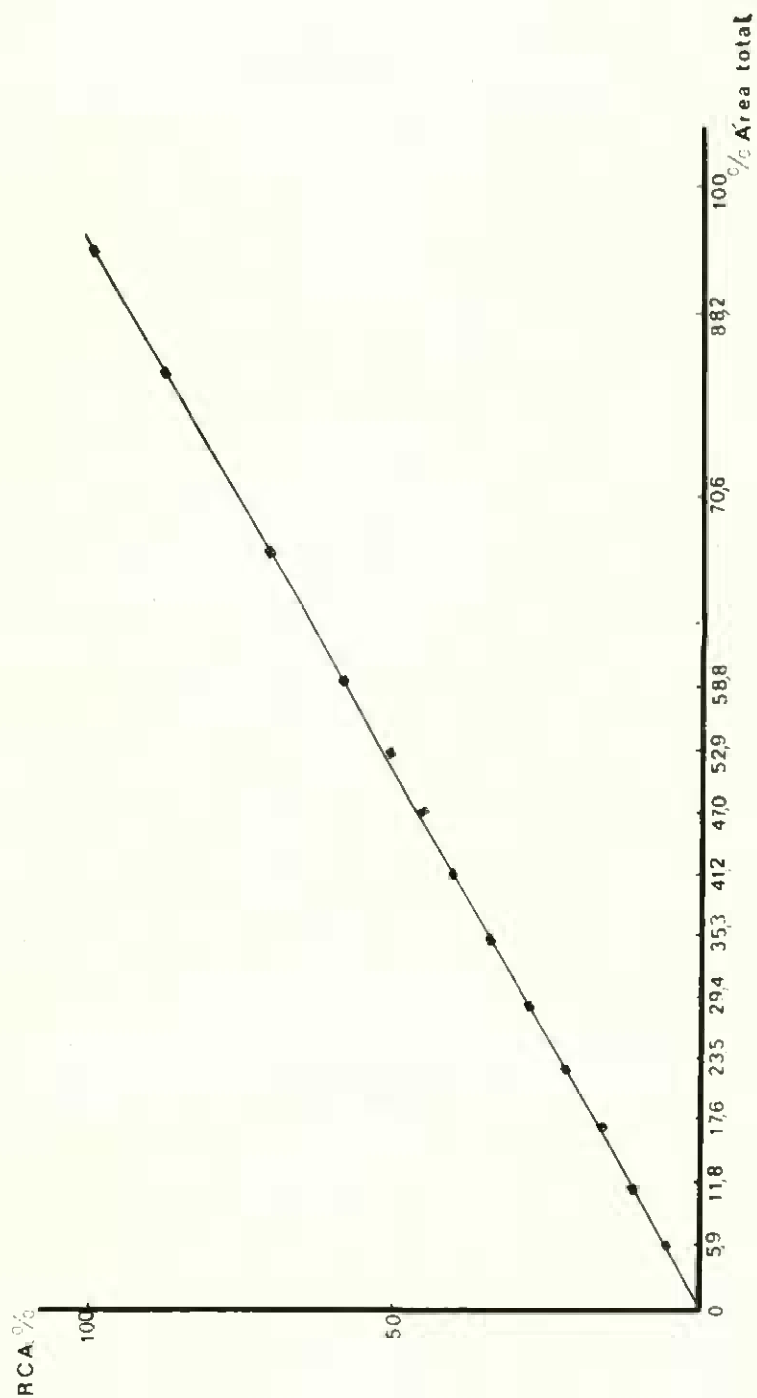
Para a *P. brassicae* usada na indústria para titular produtos à base de B.T. a 15 larvas corresponde um disco foliar de 3,85 cm de diâmetro. Para a *L. dispar* usámos um disco com aquele diâmetro ...mas o número de larvas teve de ser inferior e diferente consoante o alimento. Procurou-se que a relação entre o peso das larvas e do disco se aproximassem de uma unidade, pois verificámos que assim se conseguia que o disco foliar fosse consumido aproximadamente no período de 24 horas.

O tratamento das rodela é feito na torre de pulverização que se indicou para os testes de mortalidade. Os discos correspondentes a cada dose são tratados simultaneamente. A relação entre as doses é sempre de 1:2.

Depois de evaporado o líquido de pulverização, as rodela tratadas são postas em pequenas caixas plásticas forradas com papel de filtro

GRAFICO V

Recta de calibração do aparelho fotométrico usado nos ensaios de «titulação biológica»



humedecido e juntam-se-lhe os insectos seleccionados. O ensaio decorreu em câmaras climatizadas em condições semelhantes às dos ensaios de mortalidade.

Quando numa das testemunhas todo o disco foi consumido fez-se a leitura no aparelho fotométrico da repetição correspondente nas várias doses.

A leitura feita no galvanómetro quando se interpõe a parte do disco foliar não consumido pelas larvas (C) permite-nos exprimir a redução do consumo alimentar (R. C. A.) em relação à testemunha pela expressão:

$$R. C. A. = 100 - \frac{100 \times C \text{ (tratadas)}}{c \text{ (testemunha)}}$$

Com as médias das 4 repetições de cada dose ajustam-se graficamente curvas (redução de consumo alimentar — dose) marcando-se nas ordenadas a R. C. A. e nas abcissas as doses ou os seus logaritmos.

Como dissemos, a primeira coisa a fazer antes de montar o ensaio foi pesar as rodela e os grupos de larvas que vão ser postas em contacto com elas (Quadro IV).

QUADRO IV

Alimentos	Peso das larvas 3.º instar (gr) P	N.º Larvas por reptição	N × P	Peso das rodela de 3.85 cm diâmetro (gr)	R = $\frac{\text{Peso rodela}}{N \times P}$
Choupo	0,0210 ± 0,0021	10	0,210	0,2125	1,144
Ulmeiro	0,0190 ± 0,0005	12	0,15	0,1774	1,125
Sobreiro	0,0221 ± 0,00370	—	—	0,1231	—
Carrasco	0,0295 ± 0,00360	5	0,148	0,1780	1,203

Usando a expressão indicada determinou-se a redução do consumo alimentar e construiu-se o gráfico VI.

Não se fizeram ajustamentos analíticos uma vez que os gráficos são suficientemente elucidativos e não valia a pena interpretar estatisticamente estes dados.

Os testes já apresentados e baseados nas percentagens da mortalidade foram completamente concordantes com estes.

A estirpe E_{01} teve actuação muito idêntica com o choupo e o ulmeiro (curvas 1 e 2). As duas estirpes em choupo também apresentavam uma pequena variação entre si.

Nota-se, no entanto, uma enorme discordância entre a actuação da bactéria em ulmeiro e choupo (que foi idêntica como dissemos, curvas 1, 2 e 3) e carrasco curva 4.

Nas doses em que se notou já grande redução de consumo alimentar no choupo e ulmeiro foi todo o disco foliar consumido, quando o alimento era o carrasco. Foi necessário subir 8 vezes as doses utilizadas para se obter uma redução que permitisse traçar o gráfico (curva 4).

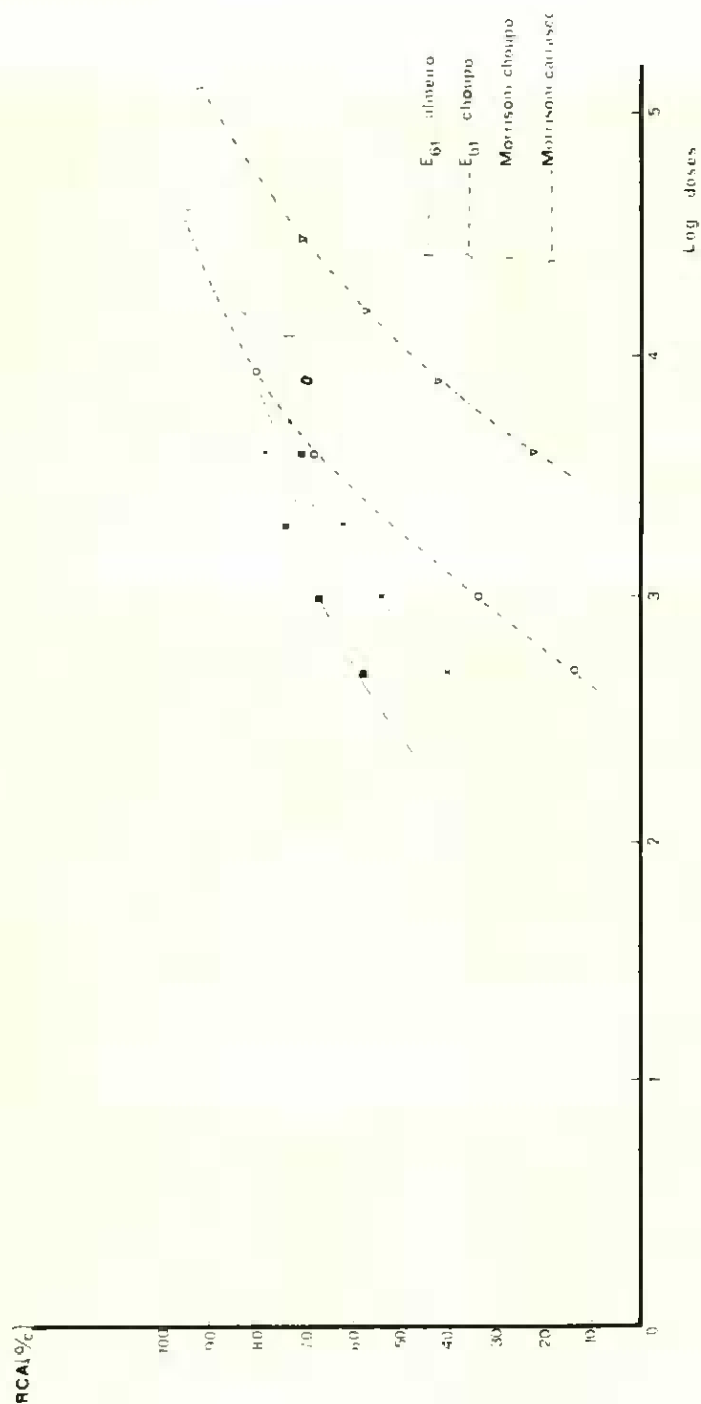
Para as larvas alimentadas de sobreiro não foi possível fazer um ensaio semelhante pois que, para se obter insectos em número suficiente nas mesmas condições fisiológicas, é preciso haver em cultura cerca de 4 vezes o número desejado. Como fizemos primeiro os testes de mortalidade e dada a dificuldade de obter folhas de sobreiro simultaneamente com as das outras espécies devido à rebentação tardia destas árvores, neste alimento tivemos possibilidade de criar um menor número de insectos.

Notámos no entanto que nos ensaios de mortalidade os discos foliares usados eram completamente consumidos nas 48 horas para todas as doses, com excepção da superior em que se começava a notar uma ligeira redução de consumo.

Podemos, portanto, considerar também com este teste dois grupos de plantas quanto à actuação da bactéria sobre a *L. dispar*; por um lado o choupo e ulmeiro que, embora apresentem por vezes diferenças, têm em geral um comportamento semelhante; por outro o sobreiro e carrasco que, tendo também um comportamento semelhante entre si, manifestam uma actuação mais fraca.

GRAFICO VI

R.C.A. da L. dispar em vários hospedeiros em virtude da infecção com *B. thuringiensis* (estirpes *Morrisoni* e *E.*)



II — COMPARAÇÃO DA ACTUAÇÃO DA ESTIRPE *SUBTOXICUS*
SOBRE LARVAS DE *EUPROCTIS CHRYSORRHOEA* L. ALIMEN-
TADAS COM CHOUPO (*POPULUS NIGRA*), AMENDOEIRA
(*PRUNUS AMYGDALOIDES*), SOBREIRO (*QUERCUS SUBER*)
E CARRASCO (*QUERCUS COCCIFERA*)

a) — CONTROLO DE MORTALIDADE

a.1) — MATERIAL E MÉTODOS

Insectos teste

Por se tratar de um insecto com hábitos muito diferentes da *L. dispar*, antes de se iniciar os ensaios, fizemos uma revisão bibliográfica do seu ciclo e modo de vida para se determinar qual a melhor época para os realizar. Notámos no entanto ser muito escassa a bibliografia portuguesa sobre a praga, (Moniz, 1907; Baeta Neves, 1951; Azevedo e Silva J., 1953; Figo e Cabral, 1967) embora ela continue a causar por vezes prejuízos consideráveis, caso dos castanheiros da região transmontana e ainda de extensões variáveis de montado de sobro. São igualmente frequentes os ataques generalizados em amendoeira e medronheiro (*Arbutus unedo*) de que se destaca para esta última espécie a mata de Leiria como uma das regiões onde a temos encontrado com maior frequência e abundância.

A portésia (*E. chrysorrhoea*) é um insecto gregário até ao 3.º instar, tendo daí em diante as larvas vida independente. O fim da

diapausa larvar coincide com a rebenteção dos hospedeiros mas segundo Grison (1946) esta diapausa é facilmente interrompida em qualquer altura se «a temperatura ambiente for suficientemente elevada (25-30 °C) e sobretudo, se houver saturação de humidade (100 °C H. R.)». Este autor conseguiu obter no laboratório duas gerações por ano quebrando a diapausa invernal e alimentando as larvas de folhas de macieira (*Pirus malus*) obtidas por forçagem em estufa; na segunda geração as larvas não teceram ninho e prosseguiram o desenvolvimento normal. Segundo ainda o mesmo autor a diapausa está relacionada com as qualidades bioquímicas das folhas pois comparando grupos mantidos a 25 °C e 90-100 % H. R. alimentados uns de folhas velhas e outros de rebenteação nova, notou que as primeiras entravam em diapausa no final do 2.º instar e as segundas não.

Como nos nossos ensaios nos interessava aproximar o mais possível das condições naturais e por ser um insecto de difícil manutenção laboratorial, optámos por uma técnica diferente da usada para a *L. dispar*.

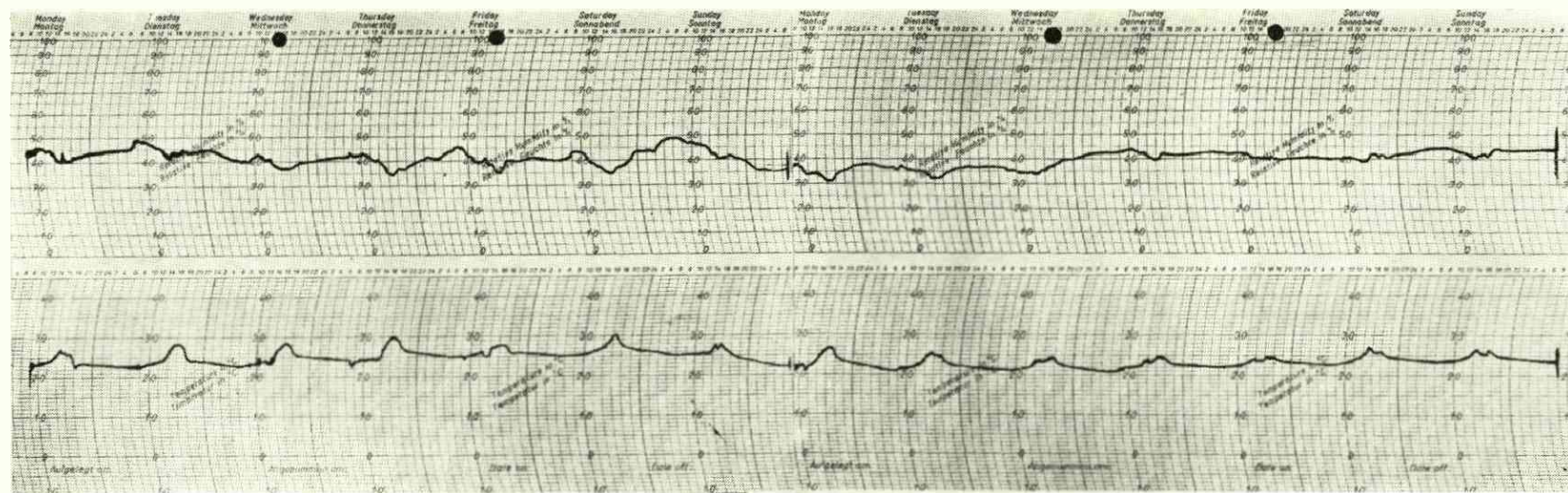
Assim colhemos nos medronheiros do sub-bosque da mata de Leiria (Estrada Nacional n.º 242), ninhos em que as larvas se encontravam em diapausa (final do mês de Março), notando-se que a rebenteação dos arbustos estava prestes a realizar-se.

Nalguns ninhos observa-se já um início de actividade mas apenas colhemos os que se apresentavam ainda em diapausa.

Quando o material chegou ao laboratório (3 de Abril) foi colocado em caixas plásticas com arejamento, inicialmente cinco ninhos por caixa e, quando as larvas se começaram a alimentar deixando os hábitos gregários, 100 larvas. Deu-se-lhes como alimento a rebenteação primaveril de amendoeira, choupo e carrasco (colhidas na Tapada da Ajuda) e os rebentos de sobreiro provenientes da regeneração natural dum pequeno montado situado no mesmo local.

A temperatura e humidade a que se efectuava a cultura foi sempre controlada e consta do gráfico da Fot. 2.

Cerca de quatro ou cinco dias após o início da alimentação as larvas realizaram uma muda e sete dias depois de adaptadas a cada um dos alimentos usámo-las nos ensaios estando nessa altura todas nas mesmas condições constituindo pois lotes homogêneos. A repetição dos ensaios realizou-se passados seis dias, usando-se larvas da mesma colheita e portanto com mais uma semana de permanência no laboratório.



Fot. 2—Temperaturas e humidades na câmara onde se fez a cultura das larvas de *E. chrysorrhoea* desde a colheita à montagem dos ensaios—2 a 16 de Abril

Produtos:

A aplicação do *B. thuringiensis* no combate à portésia atacando maceira foi já efectuado com sucesso na Rússia (Kondrya, 1969). Burgerjon (1966) seleccionou a estirpe da bactéria mais eficaz para este insecto. Como não possuíamos outra informação e nos interessava usar um só produto para poder ser suficientemente trabalhado utilizávamos a estirpe *Subtoxicus* que segundo este autor era uma das que apresentava melhor eficácia para a portésia alimentada de *Prunus domestica*. No entanto a *E. chrysorrhoea* é considerada um dos insectos bastante sensível a diversas estirpes não apresentando diferenças significativas entre as que foram ensaiadas neste trabalho.

O produto, constituído pelos cristais e esporos misturados com matéria inerte, foi obtido, como os anteriores, no Instituto Pasteur de Paris.

Delineamento do ensaio:

O esquema e o modo operatório foram os mesmos que os usados nos ensaios com *L. dispar* variando apenas a área total das folhas infectadas. Verificou-se em ensaio prévio que a quantidade de alimento suficiente para ser consumido por 10 larvas testemunhas em cerca de 24 horas era de 28 cm².

Tivemos também, que usar formas diferentes consoante as dimensões das folhas mas, como a área total foi mantida, admitimos que isto não constituía inconveniente.

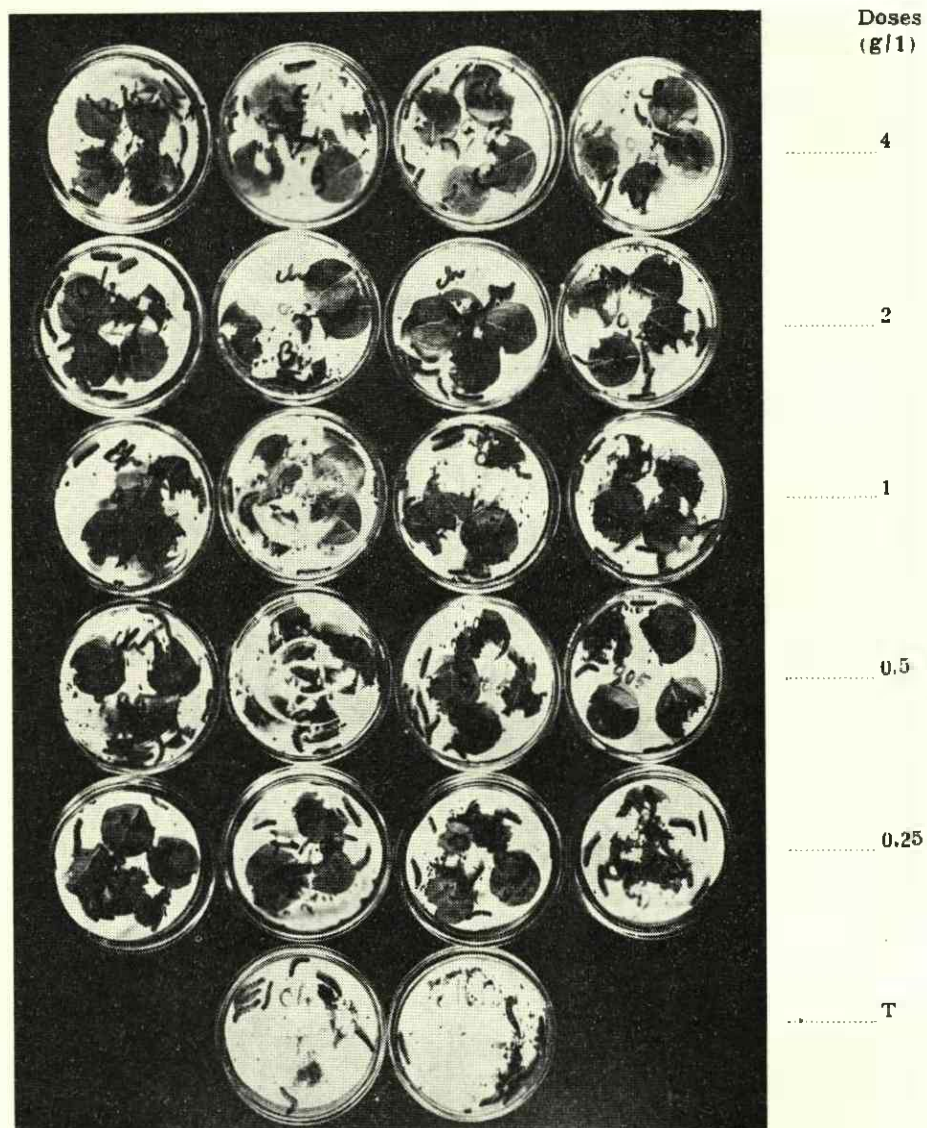
Assim, para o choupo e sobreiro, usamos 4 rodela de 3 cm de diâmetro; para o carrasco e amendoeira 4 rectângulos de 5 × 1,4 cm.

Cada ensaio constou de 4 ou 5 doses com 4 repetições sendo as doses e as datas de aplicação as indicadas no Quadro V.

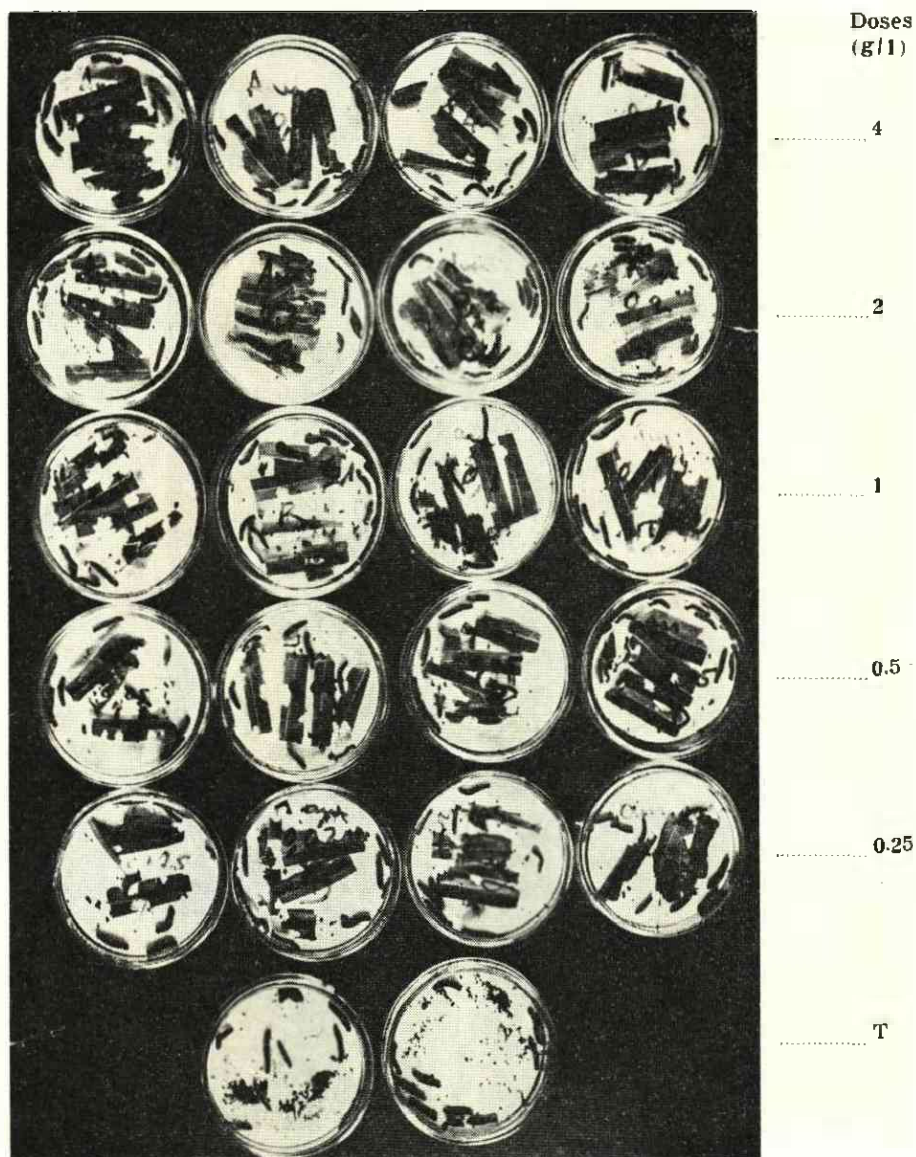
As fotografias, 3, 4, 5 e 6 mostram o aspecto do ensaio 24 horas depois de montado.

A pulverização, o tempo de contacto com o alimento, tratado, as temperaturas, humidades e horas de luz nas câmaras usadas e a duração destes foram as indicadas para a *L. dispar* e igualmente, o modo de interpretar os resultados obtidos.

Fizeram-se ainda as determinações de pH das folhas, da hemo-linfa e de intestino médio das larvas nos vários alimentos tal como foi descrito anteriormente.



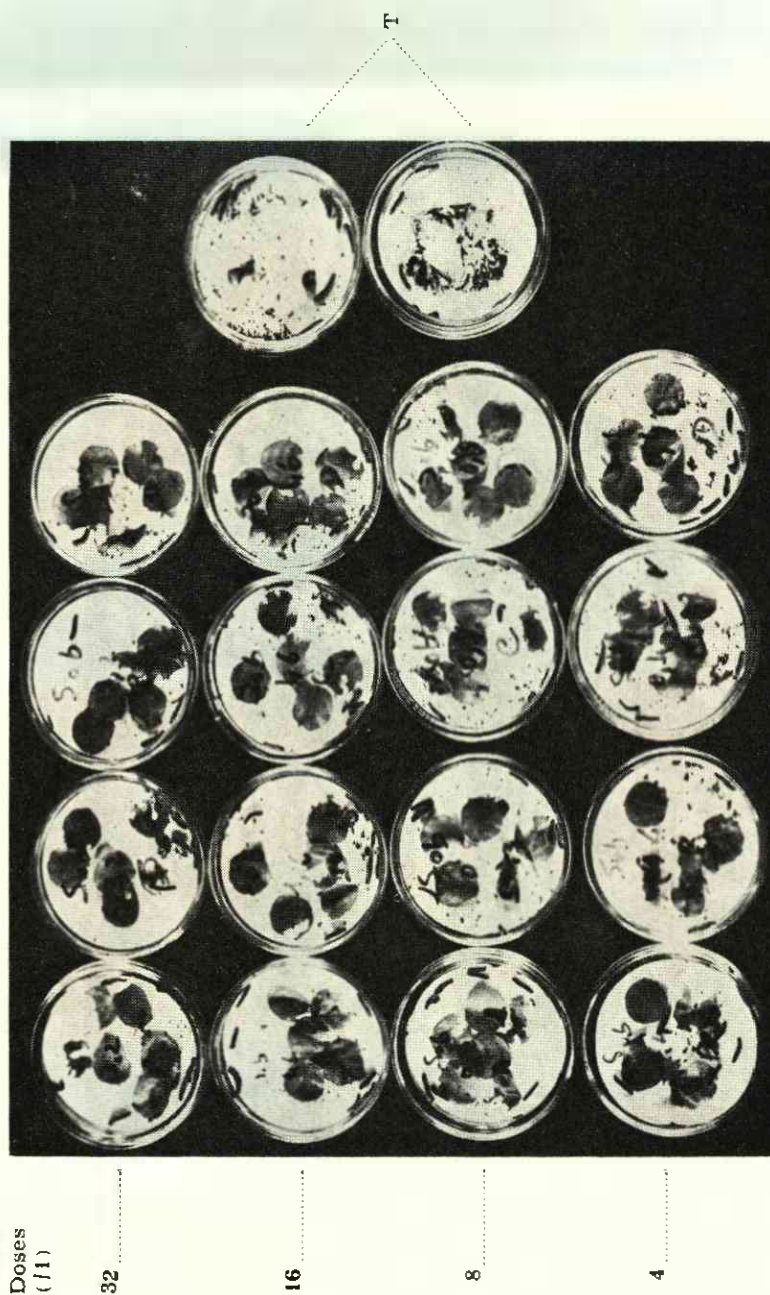
Fot. 3 — Aspecto do ensaio realizado com a *E. chrysorrhoea* alimentada de choupo 24 h. após a infecção com a estirpe *Subtoxicus* nas doses indicadas



Fot. 4 — Aspecto do ensaio realizado com a *E. chrysorrhoea* alimentada de amendoeira 24 h. após a infecção com o estirpe Subtoxicus nas doses indicadas



Fot. 5 — Aspecto do ensaio realizado com *E. chrysorrhoea* alimentada de carrasco 24 h. após a infecção com o estirpe *Subtoxicus* nas doses indicadas



Fot. 6 — Aspecto do ensaio realizado com a *E. chrysorrhoea* alimentada de sobreiro
24 h. após a infecção com o estirpe *Subtoxicus* nas doses indicadas

QUADRO V

Alimento	Produto	Dose g/l	Data de aplicação
Choupo	B. T. estirpe <i>Subtoxicus</i>	4-2-1-0,5-0,25	10/4/73 16/4/73
Amendoeira	B. T. estirpe <i>Subtoxicus</i>	4-2-1-0,5-0,25	10/4/73 10/4/73
Sobreiro	B. T. estirpe <i>Subtoxicus</i>	32-16-8-4	16/4/73 16/4/73
Carrasco	B. T. estirpe <i>Subtoxicus</i>	32-16-8-4	10/4/73 16/4/73

a.2) — RESULTADOS

Começamos por indicar os valores do pH das folhas, da hemolinfa e de intestino médio das larvas do 4.º instar da *E. chrysorrhoea* relativos aos vários alimentos.

As rectas de regressão obtidas a partir dos ensaios de mortalidade aos 6 dias feitos com os vários alimentos estão no quadro VII e gráfico VII. Foi sempre possível fazer um ajustamento perfeito em relação linear (ver valores de V_y).

Como se pode observar no gráfico e foi comprovado por interpretação estatística, a actuação da mesma estirpe (*Subtoxicus*) variou bastante consoante o alimento.

QUADRO VI

Alimento	Valores de pH		
	Folhas	Hemolinfa	Int. médio
Choupo	5,2	7,34 \pm 0,33	8,73 \pm 0,68
Amendoeira	—	7,48 \pm 0,47	8,80 \pm 0,47
Sobreiro	4,025	7,31 \pm 0,40	8,96 \pm 0,40
Carrasco	4,088	7,52 \pm 0,43	8,90 \pm 0,62

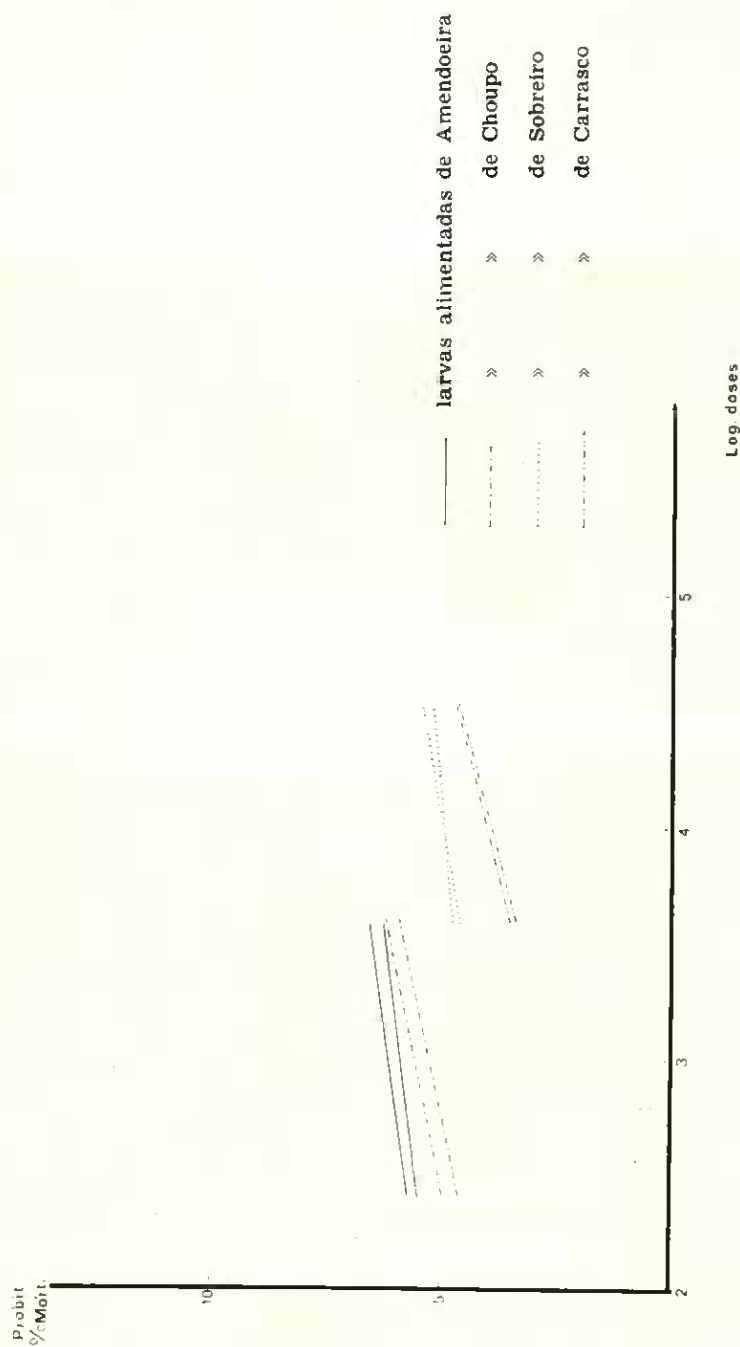
QUADRO VII

Regressões lineares referentes à actuação da estirpe Subtoxica de B. thuringiensis sobre larvas do quarto instar de E. chrysorrhoea em diversos hospedeiros

Produtos	Alimento	Regras de regressão	Vb	Vy	m + sm	DL 50 mg/l	Mortalidade referente à dose 4 g/l
<i>B. thuringiensis</i> Subtoxicus	Choupo	$y = 2,5050 + 1,0475 x$	0,1575	0,3923	$2,3973 \pm 0,03025$	249,65	89,50
		$y = 1,99995 + 1,0832 x$	0,1692	0,3688	$2,5219 \pm 0,0999$	331,61	81,50
Subtoxicus	Amendoeira	$y = 3,7343 + 0,7242 x$	0,1726	0,4350	$1,7478 \pm 0,06755$	55,95	91,00
		$y = 4,0893 + 0,7064 x$	0,1657	0,5523	$1,2892 \pm 0,10595$	19,46	94,85
Subtoxicus	Carrasco	$y = 1,7863 + 1,4389 x$	0,0960	0,5757	$4,7162 \pm 0,02690$	52025,00	5,65
		$y = 0,7421 + 1,1891 x$	0,100	0,5702	$4,8625 \pm 0,03775$	72866,67	7,20
		$y = 1,6128 + 1,4064 x$	0,0553	0,8746	$5,0016 \pm 0,05440$	103750,00	6,05
Subtoxicus	Sobreiro	$y = 1,4014 + 0,8980 x$	0,4046	0,1099	$4,0013 \pm 0,01783$	10030,0	35,75
		$y = 3,1901 + 0,4560 x$	0,7193	0,3951	$3,9782 \pm 0,03521$	9510,0	43,30

GRAFICO VII

Rectas de regressão referentes a actuação da estirpe Subtoxicus sobre larvas do 4.º instar de E. chrysorrhoea em alguns dos seus hospedeiros mais comuns em Portugal



Fez-se um teste de paralelismo para todas as rectas obtidas, que mostrou não haver diferenças significativas entre os declives, o que permite comparar os valores de DL 50.

A interpretação consistiu em ver se havia diferenças entre os dois ensaios feitos para cada alimento e por outro lado comparar as regressões referentes aos vários alimentos.

Verificou-se que havia coincidência entre as duas rectas obtidas para cada alimento, mas diferenças significativas entre as regressões referentes aos vários alimentos.

Os valores de DL_{50} são bem significativos dessas diferenças de actuação pois variam de 19, 46 e 55,95 mg/l para a mendoeira a $50,0 \times 10^3$ e $72,87 \times 10^3$ mg/l para o carrasco ou seja mais de 1000 vezes superiores. Os valores de DL_{50} para o carrasco são obtidos por extrapolação pois nos ensaios não encontramos mortalidade superior a 25 %. Para as larvas alimentadas de sobreiro, embora a mortalidade máxima obtida oscilasse entre 55 e 65%, foi, contudo ainda inferior à correspondente aos insectos mantidos no choupo e amendoeira nos quais se obteve, com a dose 0,4 % (4 g/l) uma mortalidade próxima dos 100 %.

O gráfico VIII destina-se a evidenciar a variação da mortalidade com o alimento para a mesma dose e estirpe.

As determinações de pH do intestino médio e da hemolinfa também não representaram neste caso diferenças significativas entre os insectos nos vários alimentos. Notámos como já se fez referência nos ensaios com a *L. dispar* que o conteúdo intestinal das larvas de portésia alimentadas de choupo e amendoeira era também verde claro ao passo que nos restantes alimentos era negro.

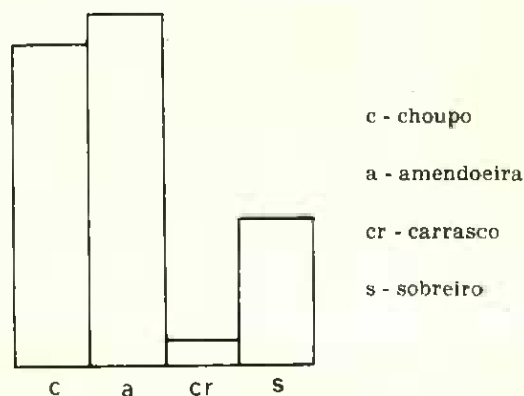
A observação dos esfregaços foi elucidativa do efeito das folhas no desenvolvimento do *B. T.* (fot. 7 a 10). A observação de 10 larvas mortas em cada uma das doses para os ensaios em choupo e amendoeira e de todas as larvas mortas nos ensaios com carrasco e sobreiro permitiram-nos construir o quadro VIII com o resumo das observações feitas.

b) — REDUÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

A técnica descrita para a *L. dispar* foi seguida quase sem alterações, a não ser quanto ao número de lagartas que tivemos que passar para 4 visto as determinações serem feitas com as larvas no 4.º instar

GRAFICO VIII

Mortalidade comparada da E. chrysorrhoea em vários hospedeiros depois da aplicação de B. thuringiensis estirpe Subtoxicus dose 4 g/l

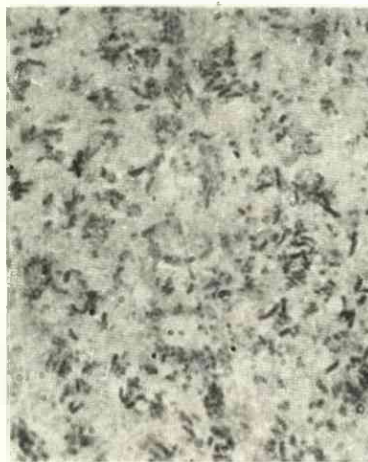


QUADRO VIII

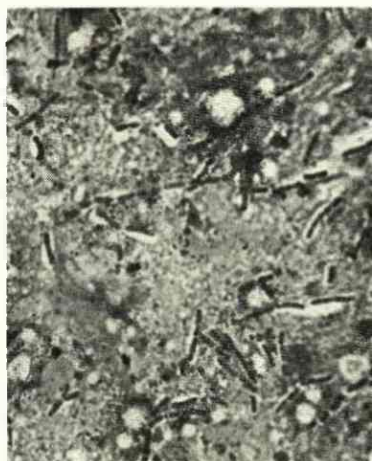
Alimento	Larvas com presença de B. T. 7 dias após infecção %	Aspectos da bactéria
Choupo	100	Grande abundância de formas vegetativas, nalguns casos associados a virose e a outra bactéria, (<i>Coccus</i>). Esporulação generalizada (Fot. 7)
Amendoeira	100	Grande abundância de esporos soltos, sempre, associados a uma outra bactéria de género <i>Coccus</i> tão abundante como o B.T. (Fot. 8)
Sobreiro	cerca de 40	Raríssimas formas vegetativas, por vezes associadas a virose e a Protozoários. Apenas numa se notou esporulação (Fot. 9)
Carrasco	cerca de 30	Raríssimas formas vegetativas apresentando deformações bem visíveis. Não se notou esporulação (Fot. 10)



Fot. 7 — *Aspecto do desenvolvimento vegetativo do B. thuringiensis 7 dias após a infecção de larvas de E. chrysorroea alimentadas de choupo*



Fot. 8 — *Aspecto do desenvolvimento vegetativo do B. thuringiensis 7 dias após a infecção de larvas de E. chrysorroea alimentadas de amendoeira*



Fot. 9 — *Aspecto do desenvolvimento vegetativo do B. thuringiensis 7 dias após a infecção de larvas de E. chrysorroea alimentadas de sobreiro*



Fot. 10 — *Aspecto do desenvolvimento vegetativo do B. thuringiensis 7 dias após a infecção de larvas de E. chrysorroea alimentadas de carrasco*

e se verificou ser este número suficiente para consumir os discos foliares não tratados, em período inferior a 24 horas. A estirpe usada e as doses foram as mesmas que nos ensaios de mortalidade.

No gráfico IX fez-se o ajustamento de curvas referentes à redução de consumo alimentar — log. dose; determinaram-se depois as equações respectivas que se indicam no quadro IX bem como os pesos das larvas usadas nos ensaios e das rodela de folhas tratadas.

Se repararmos nas fotografias 3, 4, 5 e 6 vemos claramente que enquanto nos ensaios em carrasco toda a folha tratada foi consumida no período de 24 horas só se notando uma certa redução para a dose superior (32 g/l), em sobreiro já houve maior redução para as mesmas doses e nos ensaios de choupo e amendoeira, começa a observar-se uma grande redução de alimento a partir da dose 0,25/l.

Os resultados obtidos por redução de consumo alimentar são concordantes com as de mortalidade, notando-se igualmente grandes diferenças entre os resultados obtidos nos ensaios em choupo e amendoeira nos quais o insecto deixa de se alimentar a partir de doses muito fracas em contraste com o sobreiro e o carrasco em que a paragem de alimentação só se verifica para doses muito elevadas.

QUADRO IX

Alimento	Peso das larvas de <i>E. chrysorrhoea</i> 4.º instar (g)	Peso das rodela de folhas tratadas (g)	Equações referentes à redução do consumo alimentar — log dose
Choupo	0,076	0,1571	$y = 161,4 + 175,4 x - 30,4 x^2$
Amendoeira	0,055	0,1760	$y = 6,6 + 56,2 x - 9,2 x^2$
Sobreiro	—	0,1231	$y = 455,4 + 263,7 x - 32,8 x^2$
Carrasco	0,050	0,1780	$y = 1369,4 + 638,1 x - 70,6 x^2$

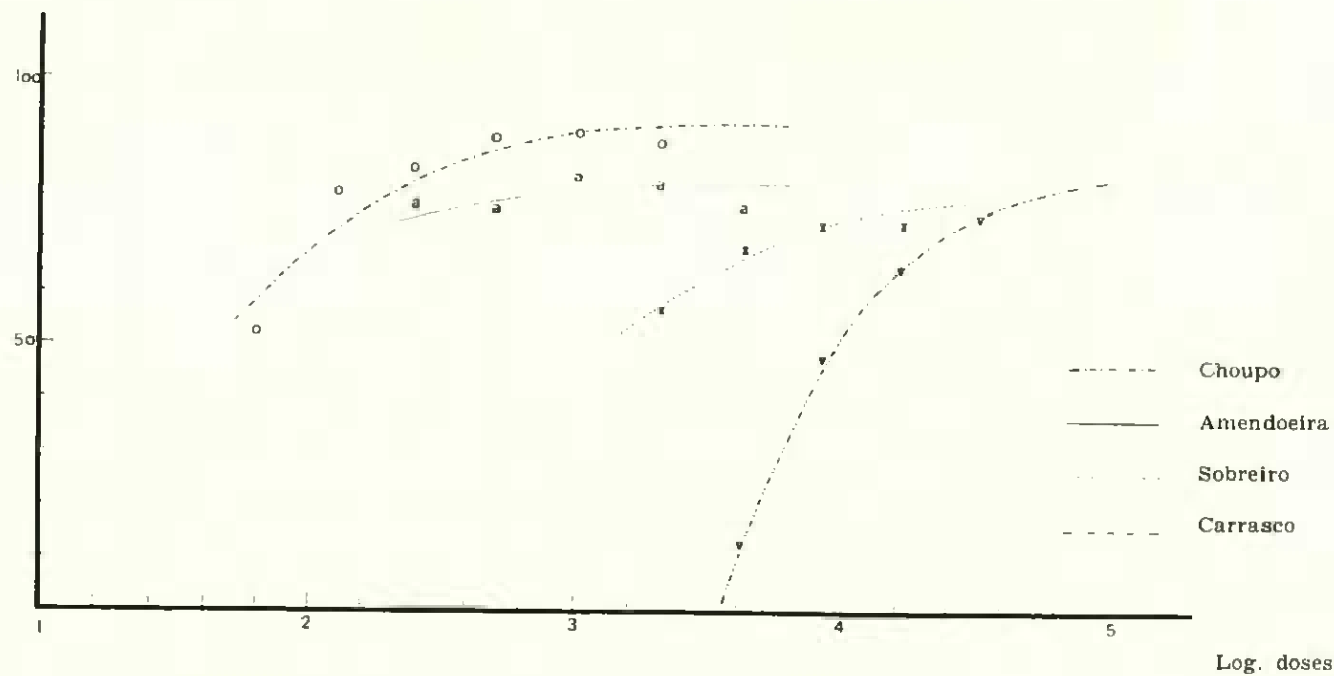
CONCLUSÕES

Tanto nos ensaios em que se avaliou a eficácia das bactérias através da mortalidade como nos que se usou a redução do consumo alimentar se notou uma grande diminuição do seu efeito quando o alimento da *L. dispar* e *E. chrysorrhoea* era uma das espécies de

GRAFICO IX

Redução alimentar de larvas da E. chrysorrhoea infectadas com estirpe Subtoxicus (gráfico de conjunto)

Redução do
consumo (%)



Quercus. Estes ensaios pretendiam confirmar os obtidos em ano anterior, apenas para o primeiro dos insectos alimentado de sobreiro e de choupo em que se tinha verificado uma melhor actuação da bactéria para o segundo hospedeiro.

Tentamos agora, em face dos resultados obtidos, analisar esta variação de comportamento comum a ambos os insectos.

Como dissemos a bactéria actua das duas maneiras: através da toxina dos seus cristais (cujo primeiro sintoma é a paragem da alimentação originando morte por intoxicação) e pelo desenvolvimento no interior do intestino da larva, dos esporos de bactéria ingeridos (mortalidade por infecção).

Nos nossos ensaios houve diferença da eficácia da bactéria sobre os dois insectos nos vários hospedeiros, tanto no que se refere à acção dos cristais, pois a redução do consumo alimentar só se verificou para doses muito elevadas, como ao desenvolvimento dos esporos — mortalidade a partir de doses muito mais elevadas quando o hospedeiro era o *Quercus suber* e o *Q. coccifera* e alterações no aspecto das formas vegetativas como mostrámos nas microfotografias.

Esperamos através de ensaios posteriores em que se estudará a acção de extractos de folhas directamente sobre a bactéria interpretar a causa da alteração do seu poder patogénico.

Admitimos no entanto desde já que a actuação da bactéria sobre os dois insectos está dependente do hospedeiro e que embora se tenha verificado uma maior alteração da eficácia quando os insectos atacavam carrasco, nos ensaios em sobreiro houve igualmente diferenças significativas em relação ao choupo e ulmeiro ou amendoeira.

Perante os resultados obtidos com os dois insectos, dos quais a *E. chrysorrhoea* é considerada na bibliografia como bastante sensível a muitas das estirpes de *B. thuringiensis*, admitimos que este comportamento se poderá generalizar às restantes pragas dos montados de sobreiro.

Sendo assim, o combate a estas pragas não poderá ser satisfatoriamente conseguido com esta bactéria. Com efeito, são precisas doses muito elevadas para se obter uma mortalidade razoável o que, dado o custo actual destes produtos, torna a sua aplicação economicamente incomportável. No campo da luta biológica contra a *L. dispar* e *E. chrysorrhoea* restam-nos ainda os vírus que estão a ser aplicados com bons resultados em vários países, a que já fizemos referência em trabalho anterior e ainda, os parasitas e predadores e sobretudo os atractivos sexuais pertencentes à «terceira geração» de insecticidas

e que no caso da *L. dispar* têm sido bastante estudados e já foram sintetizados em laboratório o que abre perspectivas da sua utilização.

O estudo da dinâmica das populações da *L. dispar* e *E. chrysorrhoea*, há algum tempo iniciado em alguns dos países onde os insectos causam prejuízos avultados, vieram demonstrar que os seus ataques são cíclicos estando as flutuações dependentes dos parasitas, predadores e doenças que conseguem fazer baixar as populações sem muitas vezes ser necessário nenhum tratamento.

A decisão de se recorrer a uma intervenção contra qualquer destas pragas deverá basear-se num estudo económico que relacione os vários factores de que ela depende com o cálculo dos prejuízos por ela causados e com o custo dos vários tratamentos que se poderão utilizar.

Os insecticidas biológicos deverão por isso ser exaustivamente estudados para se possuírem dados que permitam no momento de escolha tomá-los em consideração.

Salienta-se no entanto que na maioria dos casos a Protecção Florestal se deve limitar à profilaxia com base no estudo das causas que estão na origem do surto da praga.

RESUMO

Estudou-se a influência do hospedeiro na actuação do *B. thuringiensis* sobre duas pragas dos montados: a *L. dispar* e a *E. chrysorrhoea*. Para a primeira espécie ensaiaram-se os serotipos 1 (E_{01}) e 8 (Morrisoni) — e o produto comercial Dippel — sobre larvas no 3.º instar, alimentadas de *Q. suber*, *Q. coccifera*, *Populus nigra* e *Ulmus scabra*. Para a segunda, as larvas estavam no 4.º instar e o serotipo ensaiado foi o *Subtoxicus* sendo os hospedeiros idênticos aos anteriores, com excepção de *Ulmus scabra*, que foi substituído por *Prunus amygdaloides*. Os resultados dos ensaios biológicos baseados na observação da mortalidade e redução do consumo alimentar foram semelhantes para os dois insectos, mostrando ser muito melhor a actuação do B.T. no choupo, ulmeiro ou amendoeira que nos dois *Quercus*. Destes, o *Q. coccifera* inibiu o efeito do E_{01} e Morrisoni para a *L. dispar* e reduziu bastante a mortalidade da *E. chrysorrhoea* nos ensaios com a estirpe *Subtoxicus*. A redução do consumo alimentar começou a verificar-se para os dois insectos a partir de doses muito mais elevadas, o que nos leva a concluir que o alimento influencia a acção tanto do esporo como do cristal bacteriano. A determinação do pH da hemo-

linfae do intestino médio, assim como do peso das larvas, não permitiu explicar as diferenças observadas. Concluiu-se que as características das folhas são responsáveis pelas diferenças de actividade do *Bacillus thuringiensis*.

SYNOPSIS

The efficiency of B. T. to infect two cork-oak (*Quercus suber*) pests, *L. dispar* and *E. chrysorrhoea* was studied. Third instar larvae of *L. dispar* fed on *Q. suber*, *Q. coccifera*, *Populus nigra* and *Ulmus scabra* were infected with serotypes 1 (E_{61}) and 8 (Morrisoni). Caterpillars of *E. chrysorrhoea* in the 4h instar fed on *Q. suber*, *Q. coccifera*, *Populus nigra* and *Prunus amygdaloides* were infected with the serotype Subtoxicus. Dose-mortality regression lines were similar for both species. The efficiency of infection was much better for *Populus nigra* and *Ulmus scabra* or *Prunus amygdaloides* than for both *Quercus* species. *Q. coccifera* inhibited the action of E_{61} and Morrisoni serotypes on *L. dispar* and reduced the Subtoxicus serotype action on *E. chrysorrhoea*. Dose-feeding reduction curves matched the mortality, leading to the conclusion that the host plants act both on spore and crystal activity. Blood and mid-gut pH as well as fresh weight of caterpillars were determined, but the results were not conclusives. From this we concluded that presumably leaf characteristics were responsible for differences in efficiency of B. T.

Agradecemos ao Sr. Prof. C. M.L. Baeta Neves a revisão do trabalho bem como o interesse com que acompanhou a sua realização, dando sugestões que foram muito úteis para a resolução dos problemas surgidos durante a sua execução.

BIBLIOGRAFIA

AZEVEDO E SILVA, J. M.

- 1953 — Subsídios para o estudo da *Euproctis chrysorrhoea* L em Portugal. Relatório Final do Curso de Eng.º Silvicultor.

BAETA NEVES, C. M. L.

- 1951 — Os insectos prejudiciais do Castanheiro em Portugal *Gazeta das Aldeias* 2220.

BOVEY, P.

- 1970 — Impact de l'insect déprédateur sur la forêt *Rev. For. Française* N.º spécial.

BONNEFOI, BURGERJON et GRISON

- 1958 — Microbiologie — Titrage biologique de spores de *Bacillus thuringiensis* Berliner.
Compt Rend Ac. Sci. Paris 1418-1420.

BURGERJON, A.

- 1959 — Titration et definition d'une unité biologique pour les préparations de *Bacillus thuringiensis* Berliner *Entomophaga* 4: 201-206.
- 1962 — Relation entre l'intoxication provoquée par *Bacillus thuringiensis* Berliner et la consommation chez *Pieris brassicae* L.
Ann. Epiphytie 13 (1): 59-72.
- 1965 — Le titrage biologique des cristaux de *Bacillus thuringiensis* Berliner par réduction de consommation au laboratoire de la Ministère.
Entomophaga 10: 21-26.

BURGES, H.

- 1967 — Standardization of *B. thuringiensis* products: homology of the standard.
Nature (London) 215: 664-665.

CABRAL, M. T.

- 1973 — Activity of nine *Bacillus thuringiensis* strains on *Lymantria dispar* L.
Plant Prot, Beograd 24 (124, 125): 197-203.

DULMAGE, H.

- 1970 — Delta-endotoxin (H D-1) of *B. thuringiensis* for control of Lepidoptera on cotton.
23 rd. *Ann. Compt. on Cotton insect Research and control* Houston, Texas.

FIGO, M. T. e CABRAL, M. T.

- 1967 — Contribuição para o conhecimento da *Euproctis chrysorrhoea* L. Estudos ecobiológicos e ensaios de melos de luta.
Publ. de D. G. S. F. A. *Estudos e Informações* n.º 235.

GOEDEN

- 1969 — A photometric technique for quantitative evaluation of feeding preferences of phytophagous insects.
Annals of the Ent. Soc. Am. 62 (2):319-327.

GRISON, P.

- 1948 — Development sans diapause des chenilles de *Euproctis phaeorrhaea* (Lep. Liparidae).
C. R. Acad. Sc. Paris, 225: 1089-90.

HEITOR, F. e CABRAL, M. T.

- 1967 — Modo de acção de *B. thuringiensis* em *Thaumetopoea pityocampa* Schiff. Consideração sobre o pH do intestino e da hemolinfa.
Publ. de D. G. S. F. A. *Estudos e Informações* N.º 236.

KONDRYA, V. S.

- 1969 — The survival and voracity of larvae of the brow-tail moth when infected with different bacterial preparations and in relation to spore dose.
In Russian-Trudy moldav. Vinogor.-isseled.
Inst. Sadov. Vinogor. Vinod.

MEADOW, S. D. e OUTROS

- 1973 — *Os limites do crescimento.*
Publ. Dom Quixote, Lisboa.

MONIZ, C.

- 1907 — Instruções sobre o meio de proceder ao tratamento dos castanheiros e outras árvores atacadas por espécies nocivas de Bombycideos.
Publ. Lab. Path. Vegetal.

SPLITTSTOESSEN, C. M. and MCEWEN, L. L.

- 1961 — A bioassay technique for determining the insecticidal activity of preparation containing *B. thuringiensis* Berliner.
J. Insect. Path. 3: 391-398.

WASSINK

- 1972 — Standardization of *B. thuringiensis* preparation. A new bioassay method with *Pieris brassicae* as test insect.
J. Inv. Path. 19: 361-365.

